

Urease and nickel in plant physiology

Ureasa y níquel en la fisiología de las plantas

Teresita de Jesús Rodríguez-Jiménez¹; Dámaris L. Ojeda-Barrios^{1*};
Fidel Blanco-Macías²; Ricardo David Valdez-Cepeda^{2,3}; Rafael Parra-Quezada¹

¹Universidad Autónoma de Chihuahua, Facultad de Ciencia Agrotecnológicas. Ciudad Universitaria s/n. Chihuahua, Chihuahua, C. P. 31310, MÉXICO.

dojeda@uach.mx, tel.: (614) 4391844 (*Corresponding author).

²Universidad Autónoma Chapingo, Centro Regional Universitario Centro-Norte. Calle Cruz del Sur núm. 100, col. Constelación, El Orito, Zacatecas, C. P. 98085, MÉXICO.

³Universidad Autónoma de Zacatecas, Unidad Académica de Matemáticas. Calzada Solidaridad s/n, Zacatecas, Zacatecas, C. P. 98064, MÉXICO.

Abstract

This review compiles and discusses current scientific information relating to the role of urease in plants; moreover, it addresses its catalytic function, distribution, influence of pH on hydrolysis of urea and Ni as a cofactor in its activation. This enzyme is of vital importance in nitrogen metabolism. To be activated, urease requires binding with two nickel (Ni) atoms, and in plant cells it participates in the metabolism of compounds containing nitrogen (N). To date, urease activation appears to be the only enzymatic function of Ni in higher plants. The importance of Ni in the physiological and biochemical processes of plants, and the typical responses to the presence of Ni in soil and plants are discussed. Evidence of a close relationship between urease and Ni in the physiology of some plants is provided, thereby indicating that urease activity could be considered as a biochemical indicator of Ni deficiency before symptoms are visibly present.

Keywords: micronutrient, metalloenzyme, catalysis, cofactor.

Resumen

En la presente revisión se compila y discute la información científica actual referente a la función de la ureasa en las plantas; además, se aborda su función catalítica, distribución, influencia del pH en la hidrólisis de la urea y Ni como cofactor en su activación. Esta enzima es de vital importancia en el metabolismo nitrogenado. Para ser activada, la ureasa requiere unirse con dos átomos de níquel (Ni), y en las células vegetales participa en el metabolismo de los compuestos que contienen nitrógeno (N). La activación de la ureasa parece ser, hasta la fecha, la única función enzimática del Ni en las plantas superiores. Asimismo, se plantea la importancia del Ni en los procesos fisiológicos y bioquímicos de la planta, se incluyen las respuestas típicas frente a la presencia del Ni en el suelo y planta, y se evidencia una estrecha relación entre la ureasa y el Ni en la fisiología vegetal de algunas plantas, por lo tanto, su actividad podría ser considerada como un indicador bioquímico de deficiencia de Ni antes de que se presente la sintomatología de manera visible.

Palabras clave: micronutrimiento, metaloenzima, catálisis, cofactor.



Introduction

Confirmation that Ni is an essential nutrient for plants was demonstrated by proving its function in urease activity. Some studies have shown that Ni is a mobile element in plants and accumulates in leaves and seeds of barley (*Hordeum vulgare* L.) (Brown, Welch, & Cary, 1987a; Wood, Reilly, & Nyczepir, 2004a). Even Ni deficiency symptoms have been induced in wheat (*Triticum aestivum*), oats (*Avena sativa*) and barley (*Hordeum vulgare*), showing interveinal chlorosis similar to that caused by deficiency of Fe, Mn, Zn and Cu (Brown, Welch, Cary, & Checkai, 1987b).

Urease is an enzyme that is activated by the interaction of two Ni atoms. A reaction catalyzed by this enzyme is the hydrolysis of urea, having as products carbonate and ammonia, followed by a spontaneous reaction of another molecule of ammonia and carbonic acid. This enzyme is important in nitrogen metabolism; however, its activity can be blocked or reduced in the absence of Ni (Wood, Reilly, & Nyczepir, 2004d). This element is required for the metabolism of plants in amounts below 0.001 mg·kg⁻¹ dry weight. Lack of Ni also disrupts the assimilation of nitrogen and carbon during foliage expansion (Bai, Reilly, & Wood, 2007b). Necrotic spots associated with Ni deficiency are due to the accumulation sites of urea or oxalic and lactic acids, indicating that there are changes in carbon metabolism, particularly in reduced respiration (Klucas, Hanus, Russell, & Evans, 1983; Wood, Reilly, & Nyczepir, 2004b).

In this context, this paper sets out the state of knowledge concerning the importance of urease and Ni in physiological and biochemical processes of plants, as well as their responses to the presence of Ni in soil.

Ni in soil

Heavy metals are present in the soil as a result of anthropogenic activities or natural components thereof (Bosiacki & Wojciechowska, 2012). Different metals which are part of minerals, such as magnesium (Mg) and nickel (Ni), can be found. Ni is found in the soil in various forms, such as niccolite (NiAs), garnierite and as Fe and Ni sulphides (Wood et al., 2004a).

In the Earth's crust there is similarity between the distribution of Ni, Co and Fe. In the surface soil horizons (topsoil), Ni appears to be linked to organic forms, some of which can be found in the form of easily soluble chelates. In the soil, heavy metals may be present as free or available ions, compounds of soluble metal salts or insoluble or partially solubilizable compounds (oxides, carbonates and hydroxides) (Bai, Reilly, & Wood, 2007a).

Introducción

La confirmación de que el Ni es un nutrimento esencial para las plantas se demostró al comprobar su función en la actividad de la ureasa. Algunos trabajos han demostrado que el Ni es un elemento móvil en la planta y se acumula en hojas y semillas de cebada (*Hordeum vulgare* L.) (Brown, Welch, & Cary, 1987a; Wood, Reilly, & Nyczepir, 2004a). Inclusive, los síntomas de deficiencia de Ni han sido inducidos en trigo (*Triticum aestivum*), avena (*Avena sativa*) y cebada (*Hordeum vulgare*), mostrando clorosis intervenal semejante a la provocada por la deficiencia de Fe, Mn, Zn y Cu (Brown, Welch, Cary, & Checkai, 1987b).

La ureasa es una enzima que se activa con la interacción de dos átomos de Ni. Una reacción catalizada por esta enzima es la hidrólisis de urea, teniendo como productos carbonato y amoníaco, seguida por una reacción espontánea de otra molécula de amoníaco y ácido carbónico. Esta enzima es importante en el metabolismo del nitrógeno; sin embargo, su actividad puede ser bloqueada o disminuida en ausencia de Ni (Wood, Reilly, & Nyczepir, 2004d). Este elemento es requerido para el metabolismo de las plantas en cantidades menores de 0.001 mg·kg⁻¹ de peso seco. La falta de Ni también interrumpe la asimilación del nitrógeno y el carbono durante la expansión del follaje (Bai, Reilly, & Wood, 2007b). Las manchas necróticas asociadas con la deficiencia de Ni se deben a los sitios de acumulación de urea o de los ácidos oxálico y láctico; lo que también indica que existen cambios en el metabolismo del carbono, en particular en la reducción de la respiración (Klucas, Hanus, Russell, & Evans, 1983; Wood, Reilly, & Nyczepir, 2004b).

En este contexto, el presente documento expone el estado del arte de la importancia de la ureasa y el Ni en los procesos fisiológicos y bioquímicos de las plantas, así como sus respuestas a la presencia del Ni en el suelo.

El Ni en el suelo

Los metales pesados están presentes en el suelo como consecuencia de las actividades antropogénicas o componentes naturales del mismo (Bosiacki & Wojciechowska, 2012). Se pueden encontrar diferentes metales que forman parte de los minerales, como magnesio (Mg) y níquel (Ni). El Ni se encuentra en el suelo en diversas formas, como nickelita (NiAs), garnielita y en forma de sulfuros de Fe y Ni (Wood et al., 2004a).

En la corteza terrestre existe similitud entre la distribución de Ni, Co y Fe. En los horizontes superficiales del suelo (capa arable), el Ni aparece

Ni is of utmost importance in terms of its availability and potential for leaching of soil profiles to groundwater, and differs in terms of origin, since it can be natural or anthropogenic (Polacco, Mazzafera, & Tezzoto, 2013). This element is released into the atmosphere by human activities such as mining, smelting, fossil fuel burning, vehicle emissions, household, municipal and industrial waste, and application of chemical and organic fertilizers (Kutman, Kutman, & Cakmak, 2013).

The Ni level in the soil ranges from 0.2 to 450 mg·kg⁻¹; however, the most common values are between 5 and 22 mg·kg⁻¹. It can replace Zn, Fe and other metal ions in some other metalloenzymes of lower plants. Ni solubility is inversely related to soil pH (Halstead, Finn, & Maclean, 1969; Mulrooney & Hausinger, 2003). This element is mainly used as raw material in the metallurgical and electroplating industries, as a catalyst in the chemical and food industry, and as a component in batteries. Ni²⁺ concentrations can reach 0.2 mg·L⁻¹ and 26,000 mg·kg⁻¹ in contaminated surface water and soils, respectively (20 to 30 times more than what is found in clean areas). This type of pollution has become a global problem (McGrath & Zhao, 2003).

In order to reduce Ni soil contamination, ornamental plants are currently used for phytoremediation purposes. Some species of the families *Brassicaceae* and *Fabaceae* are suitable for improving landscape architecture and extracting this metal (Bosiacki & Wojciechowska, 2012).

Ni as an essential micronutrient

Since 2004, the Official American Association for Control of Plant Nutrients has recognized nickel as an essential element in plants, given its relationship with the urease enzyme (Wood et al., 2004a). Aksu (2002) reports that *Chlorella vulgaris* requires Ni for growth, as does barley (*Hordeum vulgare* L.). Despite the studies conducted and compared to other microelements, little is known about the metabolism or function of Ni (Figure 1) (Contreras et al., 2006). In part this is because the levels considered required for plants are low (0.001 mg·kg⁻¹ dry weight) in relation to the relative abundance of Ni in virtually all soils (above 5 kg·ha⁻¹) (Wood et al., 2004a, 2004b; Wood, Reilly, & Nyczepir, 2004c). The symptomatology in pecan (*Carya illinoensis* [Wangenh.] K.Koch) tree leaflets suffering a deformity known as “mouse-ear” is associated with the deficiency of this element (Wood et al., 2004a, 2004b, 2004c). This disorder was initially attributed to various causes such as damage caused by cold, viral diseases or deficiencies of Mn or Cu. Foliar analyses of healthy and affected leaves revealed that the symptoms are caused by a deficiency of Ni or induced by an excess of Zn in the soil (Figure 2) (Wood et al., 2004b).

ligado a formas orgánicas, parte de las cuales pueden encontrarse en forma de quelatos fácilmente solubles. En el suelo, los metales pesados pueden estar presentes como iones libres o disponibles, compuestos de sales metálicas solubles o compuestos insolubles o parcialmente solubilizables (óxidos, carbonatos e hidróxidos) (Bai, Reilly, & Wood, 2007a).

El Ni es de suma importancia en cuanto a su disponibilidad y potencial para lixiviarse de los perfiles del suelo hacia el agua subterránea, y difiere en cuanto a origen, ya que puede ser natural o antrópico (Polacco, Mazzafera, & Tezzoto, 2013). Este elemento es liberado al ambiente mediante actividades antropogénicas; tales como la minería, fundición, quema de combustibles fósiles, emisiones vehiculares, desechos domésticos, municipales e industriales, aplicación de fertilizantes y abonos orgánicos (Kutman, Kutman, & Cakmak, 2013).

El Ni varía en el suelo de 0.2 a 450 mg·kg⁻¹; sin embargo, lo más común es que los valores se encuentren entre 5 y 22 mg·kg⁻¹. Puede reemplazar al Zn, Fe y otros iones metálicos en algunas otras metaloenzimas de las plantas inferiores. La solubilidad del Ni se encuentra inversamente relacionada con el pH del suelo (Halstead, Finn, & Maclean, 1969; Mulrooney & Hausinger, 2003). Este elemento se usa principalmente como materia prima en las industrias metalúrgica y de galvanoplastia, como catalizador en la industria química y alimentaria, así como componente de las baterías. Las concentraciones de Ni²⁺ pueden llegar a 0.2 mg·L⁻¹ y 26,000 mg·kg⁻¹, en agua superficial y suelos contaminados, respectivamente (20 a 30 veces más que lo encontrado en áreas limpias). Este tipo de contaminación se ha convertido en un problema mundial (McGrath & Zhao, 2003).

Con el objetivo de reducir la contaminación de suelos con Ni, actualmente se emplean plantas ornamentales con propósitos de fitorremediación. Algunas especies de las familias *Brassicaceae* y *Fabaceae* son adecuadas para mejorar la arquitectura del paisaje y la extracción de este metal (Bosiacki & Wojciechowska, 2012).

El Ni como micronutriente esencial

Desde 2004 la Asociación Americana Oficial de Control de Nutrientes Vegetales ha reconocido al níquel como elemento esencial en plantas, dada su relación con la enzima ureasa (Wood et al., 2004a). Aksu (2002) reporta que *Chlorella vulgaris* requiere Ni para su crecimiento y se indica la necesidad de este elemento para el crecimiento de la cebada (*Hordeum vulgare* L.). A pesar de los estudios realizados y comparado con otros microelementos, poco se conoce acerca del metabolismo o la función del Ni, (Figura 1) (Contreras et al., 2006). En parte, esto es debido a que los niveles considerados requeridos para las plantas son pequeños (0.001 mg·kg⁻¹ de peso

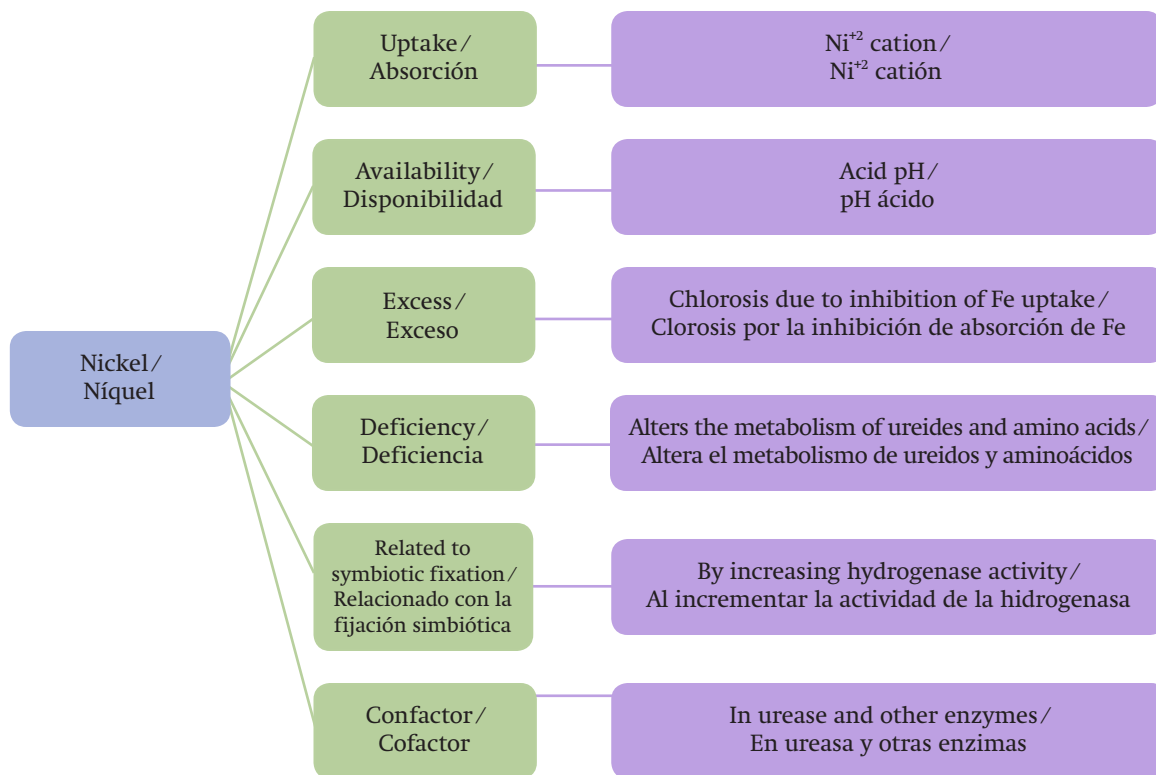


Figure 1. General aspects of nickel as a micronutrient (Wood et al., 2004a, 2004b, 2004c).

Figura 1. Aspectos generales del Níquel como micronutriente (Wood et al., 2004a, 2004b, 2004c).

Ni in plant physiology

Ni uptake in plants is mainly carried out by the root systems via passive diffusion and active transport; this varies depending on the plant species, and the form and concentration of Ni in the soil or nutrient solution. For example, soluble compounds with Ni can be absorbed through the cation transport system. Since Cu^{2+} and Zn^{2+} inhibit Ni^{2+} uptake in a competitive manner, these three soluble metal ions appear to be introduced by the same passive transport system. Ni uptake by plants depends on the concentrations of Ni^{2+} , the metabolism of the plant, the acidity of the soil or solution, the presence of other metals and composition of the organic matter. As an example, Ni^{2+} absorption by *Lathyrus sativus* increased with decreasing pH to 5.0, then decreased as the pH was raised to 8.0 (Walsh & Orme-Johnson, 1987; Mulrooney & Hausinger, 2003).

In *Berkheya coddii*, Ni^{2+} uptake is inhibited by Ca^{2+} and Mg^{2+} . However, Ca^{2+} and Mg^{2+} do not compete in the flow of Ni^{2+} in barley (*Hordeum vulgare* L.) roots, in this case with the ions Zn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} and Pb^{2+} , which inhibit Ni^{2+} . Among these Zn^{2+} and Cu^{2+} were very competitive, Co^{2+} was slightly so, and Cd^{2+} and Pb^{2+} did not appear to be competitive (Walsh & Orme-Johnson, 1987; Mulrooney & Hausinger, 2003).

Adsorption of Ni^{2+} by *Datura innoxia* is favored by the application of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)

seco) en relación con la abundancia relativa de Ni en prácticamente todos los suelos (mayor de $5 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$) (Wood et al., 2004a, 2004b; Wood, Reilly, & Nyczepir, 2004c). La sintomatología en los folíolos de nogal pecanero (*Carya illinoensis* [Wangenh.] K.Koch) que se deforman (conocida como “oreja de ratón”) está relacionada con la deficiencia de este elemento (Wood et al., 2004a, 2004b, 2004c). Inicialmente este desorden se atribuyó a varias causas como daños por frío, enfermedades virales o deficiencias de Mn o Cu. Los análisis foliares de hojas sanas y afectadas, revelaron que los síntomas son provocados por deficiencia de Ni o inducidos por exceso de Zn en el suelo (Figura 2) (Wood et al., 2004b).

El Ni en la fisiología de las plantas

La absorción de Ni en plantas se lleva a cabo, principalmente, por los sistemas radiculares a través de difusión pasiva y transporte activo; esto varía dependiendo de la especie vegetal, la forma y la concentración del Ni en el suelo o en la solución nutritiva. Por ejemplo, los compuestos solubles con Ni pueden ser absorbidos a través del sistema de transporte de cationes. Desde que el Cu^{2+} y el Zn^{2+} inhiben la asimilación de Ni^{2+} de manera competitiva, estos tres iones metálicos solubles parecen ser ingresados por el mismo sistema de transporte pasivo. La absorción de Ni por las plantas depende de las concentraciones de Ni^{2+} , el metabolismo de la planta, la acidez del suelo

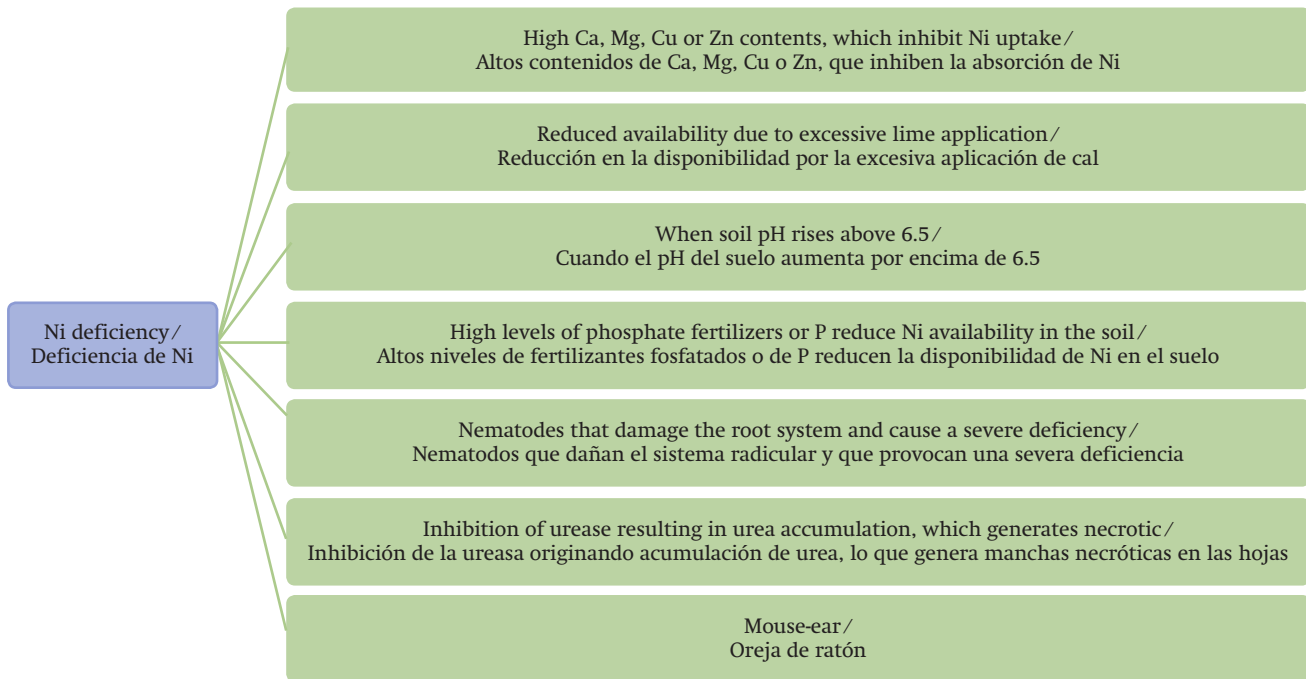


Figure 2. Nickel deficiency symptoms (Wood et al., 2004a, 2004b, 2004c).
Figura 2. Síntomas de deficiencia de Níquel (Wood et al., 2004a, 2004b, 2004c).

on the soil surface. Moreover, other factors may influence the absorption of Ni^{2+} , such as the duration of the season, the planting method and the geochemical properties of the soil (Walsh & Orme-Johnson, 1987; Mulrooney & Hausinger, 2003).

An estimated 50 % of the Ni absorbed by plants is retained in the roots; this may be due to the cation exchange sites of the xylem parenchyma cell walls and to immobilization in the root vacuoles. In addition, 80 % of the Ni in the roots is present in the vascular cylinder, while less than 20 % is in the cortex. This distribution suggests high Ni mobility in xylem and phloem.

Ni is carried from the roots to the shoots and leaves through the transpiration stream by means of xylem. This element is supplied to the meristematic parts of plants by retranslocation from old to new leaves, and to buds, fruit and seeds through phloem. This transport is closely regulated by metal-ligand or metal-protein complexes that specifically bind to Ni, such as nicotianamine (NA), histidine (His) and organic acids (citric acid and malate ions), which can act as intracellular chelates, which bind to Ni in the cytosol or in subcellular compartments for transport, translocation and accumulation in plants. Evidence has been found of the following complexes: Ni-NA in the roots of several plants such as *Thlaspi caerulescens*, Ni-His in *Alyssum lesbiacum*, *Alyssum montanum* and *Brassica juncea*, and Ni citrate in leaves of *Thlaspi goesingense* and *Thlaspi arvense* (Ghaderian, Mohtadi, Rahiminejad, & Baker, 2007).

o de la solución, la presencia de otros metales y la composición de la materia orgánica. Como ejemplo, la absorción de Ni^{2+} por *Lathyrus sativus* se incrementó con la disminución del pH hasta 5.0, luego disminuyó a medida que se elevó el pH a 8.0 (Walsh & Orme-Johnson, 1987; Mulrooney & Hausinger, 2003).

En *Berkheya coddii* la absorción de Ni^{2+} es inhibida por Ca^{2+} y Mg^{2+} . Sin embargo, Ca^{2+} y Mg^{2+} no compiten en la afluencia de Ni^{2+} en raíces de cebada (*Hordeum vulgare* L.); en este caso con los iones Zn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} y Pb^{2+} los que inhiben al Ni^{2+} . Entre estos Zn^{2+} y Cu^{2+} se mostraron muy competitivos, Co^{2+} fue ligeramente, y Cd^{2+} y Pb^{2+} parecieron no ser competitivos (Walsh & Orme-Johnson, 1987; Mulrooney & Hausinger, 2003).

La adsorción de Ni^{2+} por *Datura innoxia* es favorecida con la aplicación de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) en la superficie del suelo. Además, pueden influir otros factores en la absorción de Ni^{2+} , tales como la duración de la estación, el método de siembra y las propiedades geoquímicas del suelo (Walsh & Orme-Johnson, 1987; Mulrooney & Hausinger, 2003).

El 50 % del Ni absorbido por las plantas es retenido en las raíces; esto puede deberse a los sitios de intercambio catiónico de las paredes de las células del parénquima xilemático y a la inmovilización en las vacuolas de las raíces. Además, 80 % del Ni en las raíces está presente en el cilindro vascular; mientras que menos de 20 % se encuentra en el córtex. Esta distribución sugiere gran movilidad del Ni en xilema y floema.

It is noteworthy that the Ni forms in xylem exudates are highly influenced by pH. This element is mainly chelated by citrate at pH 5.0, and by histidine at pH 6.5. It has been found that Ni is preferably distributed in the stems and leaves of hyperaccumulators (*Allyssum bertolonii*, *Alyssum lesbiacum* and *Thlaspi goesingense*), probably in the vacuoles rather than in the cell wall. However, 67 to 73 % of the Ni in the leaves was found in the cell walls of *Thlaspi goesingense*. The consensus is that the Ni in stems and leaves is mainly located in the vacuoles, cell walls and epidermal trichomes associated with citrate, malate and malonate. Also, the amounts of this element within the different organelles and in the cytoplasm can differ substantially. Approximately 87 % of the Ni in the cells of leaves of four species was located in cytoplasm and vacuoles, while chloroplasts contain from 8 to 9.9 %, and mitochondria and ribosomes from 0.32 to 2.85 % (Kramer, Smith, Wenzel, Raskin, & Salt, 1997; Kutman, Kutman, & Cakmak, 2014).

Crop response to Ni

For three generations, barley (*Hordeum vulgare* L.) plants were grown in nutrient substrate without Ni. The germinated seeds showed extremely small concentrations of this micronutrient, and the germination percentage decreased linearly in relation to the Ni concentrations below the critical level (100 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$). In bean (*Phaseolus vulgaris*) and soybean (*Glycine max* L.), the mode of transport of NH_4^+ fixed in the root nodules mainly includes the ureides, allantoic acid and citrulline, which are transported via xylem to the leaves, and via phloem pass from the older leaves to the younger ones and developing seeds. The metabolism of these ureides implies the formation of urea, and this can only be hydrolysed in the presence of urease, an enzyme containing Ni. If the metal is not present, the urea concentration increases and behaves as a toxic compound which produces necrosis on the leaf tips. Since the degradation of the purine bases (adenine and guanine) occurs via ureides, it seems likely that all plants present and therefore need Ni to function.

In this regard, experiments in barley (*Hordeum vulgare*), although forced to reach the third generation in order to obtain seeds unable to germinate and with significant structural abnormalities, show the first criterion of essentiality of a nutrient, in this case Ni. Also, various bacteria show clear dependence on Ni, *Rhizobium* being the best known. In this species, Ni is part of the hydrogenase enzyme, responsible for the recovery of the hydrogen involved in the nitrogen fixation process (Bai et al., 2007b).

In the autumn, foliar application of Ni sulfate ($\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) induces Ni transport to the tissues of dormant stems and shoots in sufficient amounts for

El Ni es llevado de las raíces a los brotes y a las hojas a través de la corriente de transpiración por medio del xilema. Este elemento es suministrado a las partes meristemáticas de las plantas por retranslocación de hojas viejas a hojas nuevas, y a yemas, frutos y semillas a través del floema. Este transporte está estrechamente regulado por complejos metal-ligandos o metal-proteínas que se unen específicamente al Ni; tales como la nicotianamina (NA), histidina (His) y los ácidos orgánicos (ácido cítrico e iones malato), que pueden actuar como quelatos intracelulares, los cuales se unen al Ni en el citosol o en compartimentos subcelulares para el transporte, translocación y acumulación dentro de las plantas. Han sido evidenciados complejos Ni-NA en las raíces de varias plantas como *Thlaspi caerulescens*, Ni-His en *Alyssum lesbiacum*, *Alyssum montanum* y *Brassica juncea*, y Ni citrato en hojas de *Thlaspi goesingense* y *Thlaspi arvense* (Ghaderian, Mohtadi, Rahiminejad, & Baker, 2007).

Es notable que las formas de Ni en los exudados del xilema están estrechamente influenciadas por el pH. Este elemento es principalmente quelatado por el citrato en pH de 5.0, y por la histidina en pH de 6.5. Se ha encontrado que el Ni es distribuido preferentemente en las células de la epidermis en tallos y hojas de las hiperacumuladoras (*Allyssum bertolonii*, *Alyssum lesbiacum* y *Thlaspi goesingense*), probablemente en las vacuolas en lugar de en la pared celular. Sin embargo, de 67 a 73 % del Ni en las hojas se encontró en las paredes celulares de *Thlaspi goesingense*. El consenso es que el Ni en tallos y hojas está principalmente localizado en las vacuolas, paredes celulares y tricomas epidérmicos asociados con citrato, malato y malonato. Asimismo, las cantidades de este elemento dentro de los diferentes organelos y en el citoplasma pueden diferir sustancialmente. Aproximadamente 87 % del Ni, en las células de hojas de cuatro especies, se localizó en citoplasma y vacuolas; mientras que los cloroplastos contenían de 8 a 9.9 %, y las mitocondrias y ribosomas de 0.32 a 2.85 % (Kramer, Smith, Wenzel, Raskin, & Salt, 1997; Kutman, Kutman, & Cakmak, 2014).

Respuesta de los cultivos al Ni

Durante tres generaciones se cultivaron plantas de cebada (*Hordeum vulgare* L.) en sustrato nutritivo sin Ni. Las semillas germinadas presentaron concentraciones extremadamente pequeñas de este micronutriente, y el porcentaje de germinación se redujo linealmente en relación con las concentraciones de Ni menores al nivel crítico (100 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$). En el frijol (*Phaseolus vulgaris*) y la soya (*Glycine max* L.), la forma de transporte del NH_4^+ fijado en los nódulos de la raíz son los ureidos ácido alantoico y citrulina, principalmente, los cuales se transportan vía xilema hasta las hojas, y vía floema pasan de las hojas más viejas a las más jóvenes y a las semillas en desarrollo. El metabolismo de dichos

normal growth of pecan (*Carya illinoensis* [Wangenh.] K. Koch). In the spring, the leaves of the treated plants are normal in size and shape, and have 7 mg Ni·kg⁻¹, while leaves with deficiency symptoms have 0.5 mg Ni·kg⁻¹. The soils of orchards with severe deficiency contain from 0.4 to 1.4 kg Ni·ha⁻¹ (Wood, Reilly, & Nyczepir, 2006).

Pecan trees transport N as ureides in early spring. The nutritional status of N in these trees affects both ureide and amide metabolism, and the composition of spring xylem sap. In this fruit tree Ni deficiency quantitatively affects the composition of xanthine in the sap, allantoinic acid, asparagine, citrulline and β-phenylethylamine. The observed effect of Ni on nitrogen metabolism is evidence that nutrition with Ni is more important for the management of this nutrient in crops (Bai et al., 2007b).

General aspects and distribution of urease

In 1926, James B. Sumner, an assistant professor at Cornell University, showed by X-rays that urease is a crystallized protein. This work was the first demonstration that a pure protein can function as an enzyme. Urease (EC 3.5.1.5) was the first crystallized enzyme and functionally belongs to the amidohydrolase and phosphotriesterase families (Todd et al., 2006).

The molecular weight of urease is 545,000 Da. It consists of six identical subunits of 90,790 Da, organized in a trigonal bipyramidal structure. The active site is composed of a dimer of Ni (II), being distorted octahedral coordination geometry. Among other dinuclear metal hydrolases in the family, the ureases are the only ones possessing Ni (II) ions in the active site (Kojima, Bohner, & Von-Wirén, 2006). This enzyme contains four structural domains (Figure 3). One of them has a binickel center with 3.5-Å separation between the two Ni atoms.

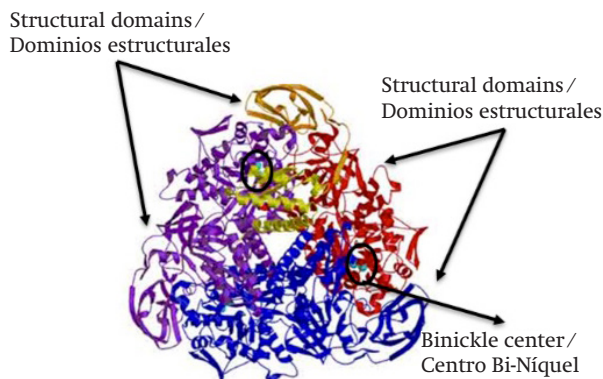


Figure 3. Urease, structural domains and binickel active center (Kojima et al., 2006).

Figura 3. La Ureasa, dominios estructurales y centro activo Bi-Níquel (Kojima et al., 2006).

ureidos implica la formación de urea, y ésta solo puede hidrolizarse en presencia de ureasa, enzima que contiene Ni. Si el metal no se encuentra presente, la concentración de urea aumenta y se comporta como un compuesto tóxico que produce necrosis en las puntas de las hojas. Dado que la degradación de las bases púricas (adenina y guanina) ocurre vía ureidos, parece probable que todas las plantas presenten y, en consecuencia, necesiten Ni para su funcionamiento.

En este sentido, los experimentos realizados en cebada (*Hordeum vulgare*), aunque obligan a llegar a la tercera generación para que se obtengan semillas incapaces de germinar y con importantes anomalías estructurales, demuestran el primer criterio de la esencialidad de un nutrimento, en este caso Ni. Asimismo, diversas bacterias presentan dependencia clara de Ni, siendo *Rhizobium* la más conocida. En esta especie, el Ni forma parte de la enzima hidrogenasa, responsable de la recuperación del hidrógeno implicado en el proceso de fijación de nitrógeno (Bai et al., 2007b).

En el otoño, la aplicación foliar de sulfato de Ni (NiSO₄ · 6H₂O) induce el transporte de Ni a los tejidos de los tallos y brotes en dormancia en cantidad suficiente para el crecimiento normal de nogal pecanero (*Carya illinoensis* [Wangenh.] K. Koch). En la primavera, las hojas de las plantas tratadas son normales en forma y tamaño, y presentan 7 mg de Ni·kg⁻¹, mientras que las hojas con síntomas de deficiencia tienen 0.5 mg de Ni·kg⁻¹. Los suelos de los huertos que presentan severa deficiencia contienen de 0.4 a 1.4 kg de Ni·ha⁻¹ (Wood, Reilly, & Nyczepir, 2006).

Los árboles de nogal pecanero transportan N como ureidos a principios de la primavera. El estado nutricional de Ni en estos árboles afecta el metabolismo tanto de ureidos como de amidas, y la composición de la savia del xilema en primavera. En este frutal la deficiencia de Ni afecta cuantitativamente la composición de xantina en la savia, ácido alantoico, asparagina, citrulina y β-feniletilamina. El efecto observado del Ni sobre el metabolismo del nitrógeno es evidencia de que la nutrición con Ni es más importante para el manejo de este nutriente en los cultivos (Bai et al., 2007b).

Aspectos generales y distribución de la ureasa

En 1926, James B. Sumner, un profesor asistente en la Universidad de Cornell, mostró mediante rayos X que la ureasa es una proteína de forma cristalizada. Este trabajo fue la primera demostración de que una proteína pura puede funcionar como una enzima. La ureasa (EC 3.5.1.5) fue la primer enzima cristalizada, y funcionalmente pertenece a las familias amidohidrolasas y fosfotriesterasas (Todd et al., 2006).

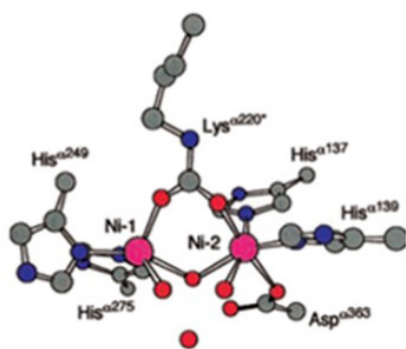


Figure 4. Separation of the two nickel atoms and the carbamylated lysine (Lebrette et al., 2014).

Figura 4. Separación de los dos átomos de Níquel y la lisina carbamilada (Lebrette et al., 2014).

A modified lysine residue (carbamylated) (Figure 4) provides a ligand with oxygen to every nickel ion, which explains why carbon dioxide is essential for activation of apoenzyme (protein part of a holoenzyme); i.e. an enzyme which cannot carry out its catalytic action devoid of the necessary co-factors, whether metal (Fe, Cu, Mg, etc.) or organic ions, which in turn can be a coenzyme or a prosthetic group (Kojima et al., 2006; Alexandrova & Jorgensen, 2007).

Activation of urease

Like many other enzymes, urease is not immediately functional, but needs to bind with two nickel atoms to be activated. Specifically, three accessory proteins called UreD, UreF and UreG form a complex capable of placing the nickel in the right place in the urease (Figure 5). Thus, once the Ni is in its site (Figure 6), the enzyme breaks down the urea and produces ammonia. Also, when the formation of the UreD-UreF-UreG complex is impeded, synthesis of active urease is inhibited (Lebrette et al., 2014).

Hydrolysis of urea

The reaction catalyzed by urease is the hydrolysis of urea to carbamic acid, which occurs 10^{14} times faster in the presence of this enzyme, having as products carbonic acid and ammonia, followed by a spontaneous reaction of another molecule of ammonia and carbonic acid (Figure 7) (Zambelli et al., 2014).

Urea can be exploited directly by the roots or aerial parts. After being absorbed it is rapidly hydrolyzed by the urease, in roots (for example in soya) or after translocation to shoots (for example maize). In soil, hydrolysis of urea usually takes place before root absorption (Almanza, Rojas, Borda, Galindo, & Galindo, 2009).

Urea is converted into ammonia and is then transformed into ammonium. This transformation into ammonium

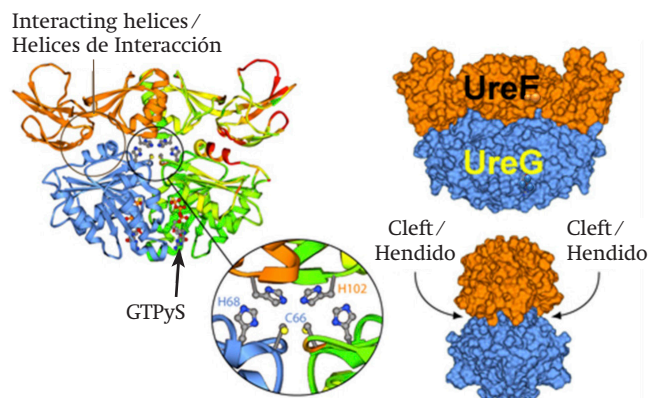


Figure 5. Activation of urease by accessory proteins (Lebrette et al., 2014).

Figura 5. Activación de la ureasa por las proteínas accesorias (Lebrette et al., 2014).

El peso molecular de la ureasa es de 545,000 Da. Consiste en seis subunidades idénticas de 90,790 Da, organizada en una estructura bipiramidal trigonal. El sitio activo está compuesto por un dímero de Ni (II), siendo la geometría de coordinación octaédrica distorsionada. Entre otras metalhidrolasas dinucleares en la familia, las ureasas son las únicas que poseen iones de Ni (II) en el sitio activo (Kojima, Bohner, & Von-Wirén, 2006). Esta enzima contiene cuatro dominios estructurales (Figura 3). Uno de ellos presenta un centro biníquel con separación de 3.5 armstrongs entre los dos átomos de Ni.

Un residuo de lisina modificado (carbamilada) (Figura 4) proporciona un ligando con oxígeno a cada níquel; lo cual explica por qué el dióxido de carbono es imprescindible para la activación de la apoenzima (parte proteica de una holoenzima); es decir, una enzima que no puede llevar a cabo su acción catalítica desprovista de los cofactores necesarios, ya sean iones metálicos (Fe, Cu, Mg, etc.) u orgánicos, que a su vez puede ser una coenzima o un grupo prostético (Kojima et al., 2006; Alexandrova & Jorgensen, 2007).

Activación de la ureasa

Como muchas otras enzimas, la ureasa no es funcional inmediatamente, sino que necesita unirse con dos átomos de níquel para ser activada. En concreto, tres proteínas accesorias denominadas UreD, UreF y UreG forman un complejo capaz de colocar el níquel en el lugar correcto en la ureasa (Figura 5). Así, una vez que el Ni está en su sitio (Figura 6), la enzima rompe la urea y produce amonio. Además, cuando se impide la formación del complejo UreD-UreF-UreG se inhibe la síntesis de ureasa activa (Lebrette et al., 2014).

Hidrólisis de la urea

La reacción catalizada por la ureasa es la hidrólisis de urea hacia ácido carbámico; la cual se produce 10^{14} veces

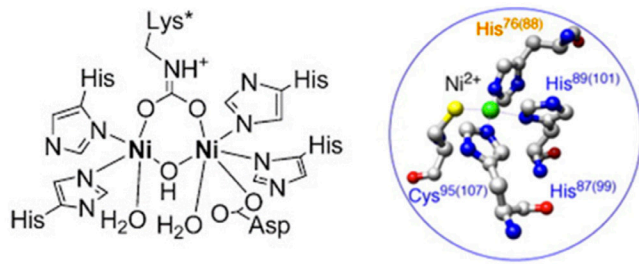


Figure 6. Accommodation of nickel in the urease active center (Lebrette et al., 2014).

Figura 6. Acomodo del Níquel en el centro activo de la ureasa (Lebrette et al., 2014).

is a hydrolysis process that, depending on the pH of the soil, gives rise to different products. Thus, at a pH higher than 6.3 urea is hydrolyzed into ammonium and bicarbonate ion, but if it is less than 6.2 it breaks down into ammonium, carbon dioxide and water (Figure 8) (Lebrette et al., 2014).

Urease in plants and Ni as cofactor

Ni deficiency inhibits urease action, and this condition leads to the accumulation of urea, which results in the presence of necrotic spots on leaves. Ni deficiency disrupts metabolism of ureides, amino acids and

más rápido en presencia de dicha enzima, teniendo como productos el ácido carbónico y el amoníaco, seguida de una reacción espontánea de otra molécula de amoníaco y ácido carbónico (Figura 7) (Zambelli et al., 2014).

La urea puede ser aprovechada directamente por las raíces o partes aéreas. Después de ser absorbida se hidroliza rápidamente por la ureasa, en las raíces (por ejemplo en soya) o después de la translocación a los brotes (por ejemplo maíz). En suelo, la hidrólisis de la urea, por lo general, se lleva a cabo antes de la absorción por raíz (Almanza, Rojas, Borda, Galindo, & Galindo, 2009).

La urea se convierte en amoníaco y después éste se transforma en amonio. Esta transformación a amonio es un proceso de hidrólisis que, dependiendo del pH del suelo, da lugar a diferentes productos. Así, a pH mayor de 6.3 la urea se hidroliza en amonio y en ion bicarbonato, pero si es menor de 6.2 se descompone en amonio, dióxido de carbono y agua (Figura 8) (Lebrette et al., 2014).

Ureasa en plantas y el Ni como cofactor

La deficiencia de Ni inhibe la acción de la ureasa, y esta condición lleva a la acumulación de urea, lo que

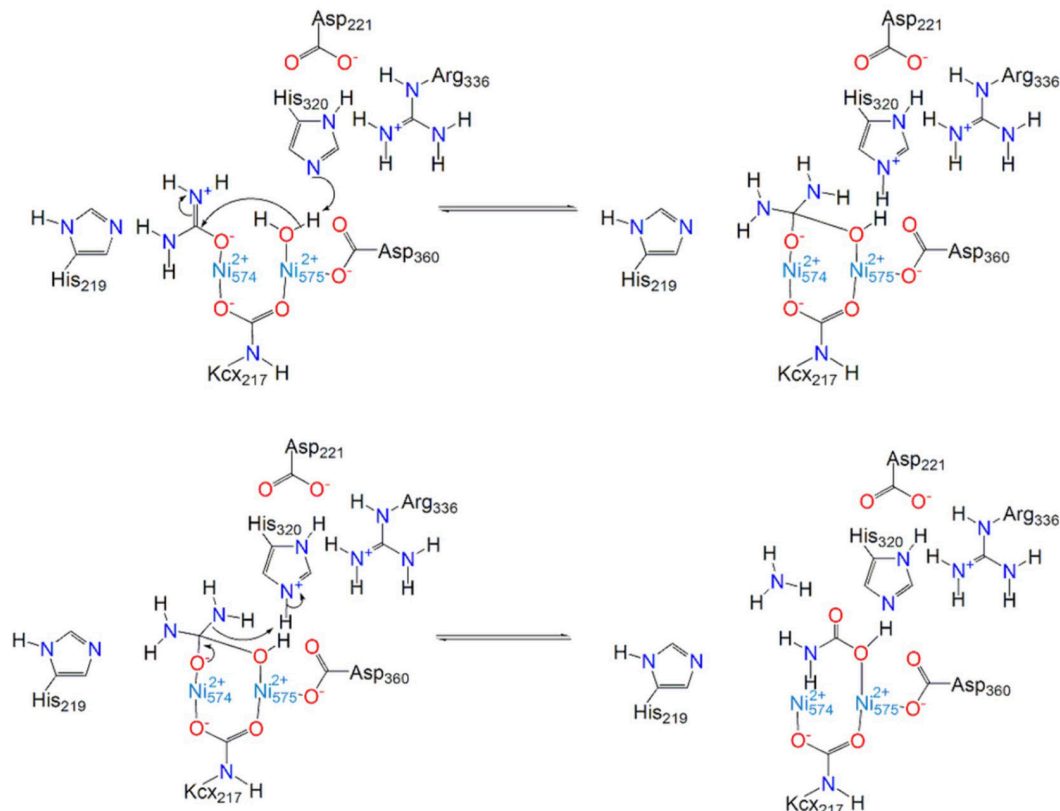


Figure 7. Reaction of nickel with water at atomic level (Zambelli et al., 2014).

Figura 7. Reacción a nivel atómico del Níquel con el agua (Zambelliet al., 2014).

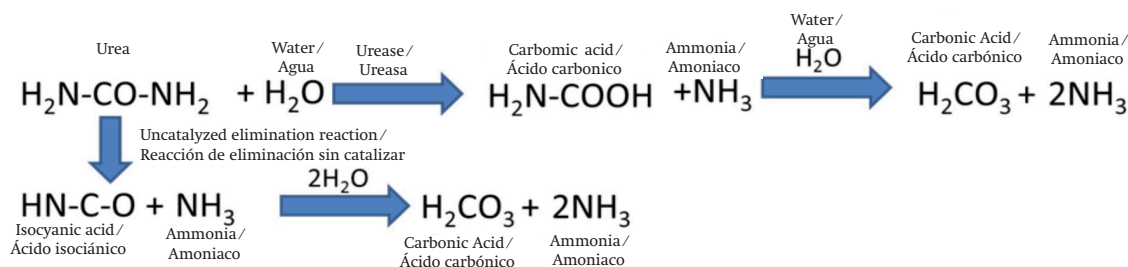


Figure 8. Hydrolysis of urea (Zambelli et al., 2014).

Figura 8. Hidrólisis de la urea (Zambelli et al., 2014).

organic acids, and the oxidative stress generated by this deficiency results in the accumulation of oxalic and lactic acids (Kutman et al., 2014). Ureide-transporting species such as pecan (*Carya illinoensis* [Wangenh.] K.Koch) have a greater N requirement than amide-transporting species, such as legumes, thereby increasing the likelihood that ureide-transporting systems may have enzymes requiring Ni for their activation or to enhance their activity (Wood et al., 2004a). The likely candidates for these systems are enzymes that affect ureide catabolism.

To date, the metabolic effects of Ni deficiency have only been reported for a few annual species. An example of this is barley (*Hordeum vulgare*), which showed alterations in the metabolism of amino acids, malate and various inorganic anions (SO_4^- , Cl^- , P and NO_3^-) (Brown, Welch, & Madison, 1990; Bai, Liping, & Wood, 2013).

Urease is linked to the cellulosic fraction of the cotyledon cell wall of different varieties of squash, including *Cucurbita ficifolia*. This plant is closely related to *Cucurbita* spp, although it is atypical in its chromosomal and biochemical characters (Vicente, Villalobos, & Hernández, 1975; Almanza et al., 2009).

The effect of foliar Ni application on *Cucurbita ficifolia* plants, at concentrations of 1.0, 2.5 and 5.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, and a control without Ni application was studied by quantifying the incidence of crystalline urease in seeds and observing the growth and morphological development of plants from first application to fruiting. Ni caused phytotoxicity in all plants. The growth of fruits and seeds was indirectly proportional to the concentrations applied. Addition of 1.0 and 2.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Ni was tolerated by the plants, but interveinal chlorosis occurred. In 100 % of the plants, 5.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Ni caused senescence of flowers, preventing fruiting. The amount of urease obtained was directly proportional to the Ni concentrations applied. The activity of this enzyme in descending order was: 1.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Ni > control > 2.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Ni. The urease obtained from each of the treatments had lower yield than the commercial treatment (Almanza et al., 2009).

provoca la presencia de manchas necróticas en hojas. La deficiencia de Ni interrumpe el metabolismo de los ureidos, aminoácidos y ácidos orgánicos, y debido al estrés oxidativo generado por esta deficiencia se acumulan los ácidos oxálico y láctico (Kutman et al., 2014). Las especies transportadoras de ureidos como el nogal pecanero (*Carya illinoensis* [Wangenh.] K.Koch) poseen mayor requerimiento de Ni que las especies transportadoras de amidas, como las leguminosas. Así aumenta la posibilidad de que los sistemas transportadores de ureidos puedan tener enzimas que requieren Ni para su activación o para intensificar su actividad (Wood et al., 2004a). Los candidatos probables para estos sistemas son enzimas que afecten el catabolismo de ureidos.

Hasta la fecha, los efectos metabólicos de la deficiencia de Ni sólo han sido reportados para unas cuantas especies anuales. Un ejemplo de lo anterior es la cebada (*Hordeum vulgare*), la cual mostró alteraciones en el metabolismo de los aminoácidos, malato y varios aniones inorgánicos (SO_4^- , Cl^- , P y NO_3^-) (Brown, Welch, & Madison, 1990; Bai, Liping, & Wood, 2013).

La ureasa se encuentra ligada a la fracción celulósica de la pared de células de cotiledones de diferentes variedades de cucurbitáceas, entre ellas *Cucurbita ficifolia*. Esta planta está estrechamente emparentada con *Cucurbita* spp., aunque es atípica en sus caracteres cromosómicos y bioquímicos (Vicente, Villalobos, & Hernández, 1975; Almanza et al., 2009).

El efecto de la aplicación foliar de Ni en plantas de *Cucurbita ficifolia*, en concentraciones de 1.0, 2.5 y 5.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y un testigo sin aplicación de Ni, se estudió al cuantificar la incidencia de ureasa cristalina en las semillas y la observación del crecimiento y desarrollo morfológico de las plantas desde la primera aplicación hasta la fructificación. El Ni causó fitotoxicidad en todas las plantas. El crecimiento de frutos y semillas fue indirectamente proporcional a las concentraciones aplicadas. La adición de 1.0 y 2.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Ni fue tolerada por las plantas, pero se presentó clorosis interveinal. En 100 % de las plantas, 5.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Ni causaron senescencia de flores, impidiendo la fructificación. La cantidad de

At pH greater than 6.3 urea undergoes the following hydrolysis: /

A pH mayor de 6.3 la urea sufre la siguiente hidrólisis:



If the pH is less than 6.2, hydrolysis of urea is as follows:

Si el pH es menor que 6.2, la hidrólisis de la urea es la siguiente:

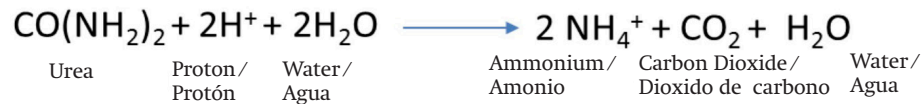


Figure 9. The pH in the hydrolysis of urea (Zambelli et al., 2014)

Figura 9. El pH en la hidrólisis de la urea (Zambelli et al., 2014).

Urease in plants

Urease catalyzes the hydrolysis of urea to produce ammonium, which can be used in the root cells. This is possible due to the presence of these enzymes in the soil, a fact exploited in urea fertilization practices (Almanza et al., 2009). It is important to note that large amounts of this compound may constitute a grave danger to plants and the environment. The use of urease inhibitors is an option to increase the application efficiency of surface N as urea up to 50 %. In foliage, urea is applied to improve absorption of foliar fertilizers. Urea is rapidly absorbed; however, it can be toxic at concentrations of 2 % or greater (Almanza et al., 2009).

By being metabolized, urea does not accumulate and can serve as a nitrogen source. Due to the generation of ammonia, it has also been hypothesized that urease plays a defensive role in which it exhibits antifungal and insecticidal properties (Figure 9) (Wood, Reilly, & Nyczepir, 2004d; Bai et al., 2007b; Zambelli et al., 2014). Urease is especially abundant in leguminous seeds; soybean (*Glycine max*) meal contains 0.012 % and bean (*Canavalia ensiformis* [L.] DC.) from 0.07 to 0.14 % (Wood et al., 2006).

Conclusions

Urease is the enzyme that catalyzes the hydrolysis of urea into carbon dioxide and ammonia, functionally, and belongs to the family of amidohydrolases and phosphotriesterases. In plant cells, this enzyme is involved in the metabolism of N-containing compounds. To date, the only enzymatic function of Ni in higher plants appears to be the activation of urease. If the metal is not present, the urea concentration increases and behaves as a toxic compound which causes necrosis on leaf tips. Since the degradation of purine bases (adenine and guanine) occurs via ureides in plants, it seems likely that all plants, not just legumes, require Ni for their operation.

End of English version

ureasa obtenida fue directamente proporcional a las concentraciones de Ni aplicadas. La actividad de esta enzima en su orden fue: 1.0 mg·L⁻¹ de Ni > testigo > 2.5 mg·L⁻¹ de Ni. La ureasa obtenida de cada uno de los tratamientos tuvo rendimiento menor que la comercial (Almanza et al., 2009).

La ureasa en plantas

La ureasa cataliza la hidrólisis de urea para producir amonio, que puede ser utilizado en las células radiculares. Esto es posible debido a la presencia de estas enzimas en los suelos, un hecho explotado en las prácticas de fertilización de urea (Almanza et al., 2009). Es importante destacar que cantidades grandes de este compuesto pueden constituir un peligro grave para las plantas y el ambiente. El uso de inhibidores de ureasa es una opción para incrementar la eficiencia de aplicación de N superficial como urea hasta 50 %. En follaje, la urea se aplica para mejorar la absorción de fertilizantes foliares. La urea es absorbida rápidamente; sin embargo, puede ser tóxica a concentraciones de 2 % o mayores (Almanza et al., 2009).

De ser metabolizada, la urea no se acumula y puede servir como una fuente de nitrógeno. Debido a la generación de amoníaco, también se ha planteado la hipótesis de que la ureasa cumple una función de defensa donde exhibe propiedades antifúngicas e insecticida (Figura 9) (Wood, Reilly, & Nyczepir, 2004d; Bai et al., 2007b; Zambelli et al., 2014). La ureasa es especialmente abundante en las semillas de leguminosas; la harina de soya (*Glycine max*) contiene 0.012 % y el frijol (*Canavalia ensiformis* [L.] DC.) de 0.07 a 0.14 % (Wood et al., 2006).

Conclusiones

La ureasa es la enzima que cataliza la hidrólisis de la urea en dióxido de carbono y amoníaco, funcionalmente, y pertenece a la familia de amidohidrolasas y fosfotriesterasas. En las células vegetales, esta enzima participa en el metabolismo de los compuestos que contienen N. Hasta la fecha, la única función enzimática

References / Referencias

- Aksu, Z. (2002). Determination of the equilibrium, kinetic and thermodynamic parameters of the batch biosorption of nickel (II) ions onto *Chlorella vulgaris*. *Process Biochemistry*, 38(1), 89-99. doi: 10.1016/S0032-9592(02)00051-1
- Alexandrova, A. N., & Jorgensen, W. L. (2007). Why urea eliminates ammonia rather than hydrolyzes in aqueous solution. *Journal of Physical Chemistry B*, 111(4), 720-730. doi: 10.1021/jp066478s
- Almanza, M. P., Rojas, H. A., Borda, G. C., Galindo, A. R., & Galindo, D. R. (2009). Aplicación foliar de níquel en *Cucurbita ficifolia* Bouché para producción de ureasa (EC 3.5.1.5) cristalina. *Agronomía Colombiana*, 27(1), 33-40. Retrieved from <http://revistas.unal.edu.co/index.php/agrocol/article/view/11328>
- Bai, C., Liping, L., & Wood, B. (2013). Nickel affects xylem Sap RNase and converts RNase A to a urease. *Plant Biology*, 13(207). doi: 10.1186/1471-2229-13-207
- Bai, C., Reilly, C. C., & Wood, B. W. (2007a). Nickel deficiency affects nitrogenous forms and urease activity in spring xylem sap of pecan. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 132(3), 302-309. Retrieved from <http://journal.ashspublications.org/content/132/3/302.full>
- Bai, C., Reilly, C. C., & Wood, B. W. (2007b). Insights into the nutritional physiology of nickel. *Acta Horticulturae*, 772, 365-368. doi: 10.17660/ActaHortic.2008.772.62
- Bosiacki, M., & Wojciechowska, E. (2012). Phytoextraction of nickel by selected ornamental plants. *Ecological Chemistry and Engineering S*, 19(3), 331-345. doi: 10.2478/v10216-011-0024-9
- Brown, P. H., Welch, R. M., & Madison, J. T. (1990). Effect of nickel deficiency on soluble anion, amino acid, and nitrogen levels in barley. *Plant Soil*, 125, 19-27. doi: 10.1007/BF00010740
- Brown, P. H., Welch, R. M., & Cary, E. E. (1987a). Nickel: A micronutrient essential for high plants. *Plant Physiology*, 85(3), 801-803. doi: 10.1104/pp.85.3.801
- Brown, P. H., Welch, R. M., Cary, E. E., & Checkai, R. T. (1987b). Beneficial effects of nickel on plant growth. *Journal of Plant Nutrition*, 10(9-16), 2125-2135. doi: 10.1080/01904168709363763
- Contreras, R., Fontal-Rivera, B., Reyes-Malavé, M., Suárez, T., Bellandini, F., Romero, I., & Cancines, P. (2006). *Algo más sobre alimentos: una visión desde la química*. México: Universidad de los Andes. Retrieved from <http://webdelprofesor.ula.ve/ciencias/Ricardo/pdf>
- Ghaderian, S. M., Mohtadi, A., Rahiminejad, M. R., & Baker, A. J. M. (2007). Nickel and other metal uptake and accumulation by species of *Alyssum* (Brassicaceae) from the ultramafics of Iran. *Environmental Pollution*, 145(1), 293-298. doi: 10.1016/j.envpol.2006.03.016
- Halstead, R. L., Finn, B. J., & Maclean, A. J. (1969). Extractability of nickel added to soils and its concentration in plants. *Canadian Journal of Soil Science*, 49, 335. Retrieved from <http://pubs.aic.ca/doi/pdf/10.4141/cjss69-046>
- del Ni en las plantas superiores parece ser la activación de la ureasa. Si el metal no se encuentra presente, la concentración de urea aumenta y se comporta como un compuesto tóxico que produce necrosis en las puntas de las hojas. Dado que la degradación de las bases púricas (adenina y guanina) ocurre vía ureidos en las plantas, parece probable que todas las plantas, y no solo las leguminosas, requieran Ni para su funcionamiento.

Fin de la versión en español

Klucas, R. V., Hanus, F. J., Russell, S. A., & Evans, H. J. (1983). Nickel: a micronutrient element for hydrogen-dependent growth of *Rhizobium japonicum* and for expression of urease activity in soybean leaves. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80(8), 2253-2257.

Kojima, S., Bohner, A., & Von-Wirén, N. (2006). Molecular mechanisms of urea transport in plants. *Journal of Membrane Biology*, 212(2), 83-91. doi: 10.1007/s00232-006-0868-6

Kramer, U., Smith, R. D., Wenzel, W. W., Raskin, I., & Salt, D. E. (1997). The role of metal transport and tolerance in nickel hyperaccumulation by *Thlaspi goesingense* Halacsy. *Plant Physiology*, 115(4), 1641-1650. doi: 10.1104/pp.115.4.1641

Kutman, B. Y., Kutman, U. B., & Cakmak, I. (2013). Foliar nickel application alleviates detrimental effects of glyphosate on grain yield and seed quality of wheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(35), 8364-8372. doi: 10.1021/jf402194v

Kutman, B. Y., Kutman, U. B., & Cakmak, I. (2014). Effects of seed nickel reserves or externally supplied nickel on the growth, nitrogen metabolites and nitrogen use efficiency of urea- or nitrate-fed soybean. *Plant and Soil*, 376(1-2), 261-276. doi: 10.1007/s11104-013-1983-7

Lebrette, H., Brochier-Armanet, C., Zambelli, B., Reuse, H., Borezié-Durant, E., Ciurli, S., & Cavazza, C. (2014). Promiscuous nickel import in human pathogens: structure, thermodynamics, and evolution of extracytoplasmic nickel-binding proteins. *Structure*, 22(10), 1421-1432. doi: 10.1016/j.str.2014.07.012

McGrath, S. P., & Zhao, F. J. (2003). Phytoextraction of metals and metalloids from contaminated soils. *Current Opinion in Biotechnology*, 14(3), 277-282. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12849780>

Mulrooney, S. B., & Hausinger, R. P. (2003). Nickel uptake and utilization by microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews*, 27, 239-261. doi: 10.1016/S01686445(03)00042-1

Polacco, J. C., Mazzafera, P., & Tezzoto, T. (2013). Opinion: nickel and urease in plants: still many knowledge gaps. *Plant Science*, 79(90), 199-200. doi: 10.1016/j.plantsci.2012.10.010

Todd, C. D., Tipton, P. A., Blevins, D. G., Piedras, P., Pineda, M., & Polacco, J. C. (2006). Update on ureide degradation in legumes. *Journal of Experimental Botany*, 57(1), 5-12. doi: 10.1093/jxb/erj013

Vicente, C., Villalobos, N., & Hernández, A. (1975). Ureasa de cucurbitáceas y su localización citológica. *Anales del Instituto*

- Botánico Cavanilles*, 32(1), 269-277. Retrieved from http://www.rjb.csic.es/jardinbotanico/ficheros/documentos/pdf/anales/1975/Anales_32%281%29_269_277.pdf
- Walsh, C. T., & Orme-Johnson, W. H. (1987). Nickel enzymes. *Biochemistry*, 26, 4901-4906. doi: 10.1021/bi00390a001
- Wood, B. W., Reilly, C. C., & Nyczepir, A. P. (2004a). Mouse-ear of pecan: I. Symptomology and occurrence. *HortScience*, 39(1), 87-94. Retrieved from <http://hortsci.ashspublications.org/content/39/1/87.full.pdf+html>
- Wood, B. W., Reilly, C. C., & Nyczepir, A. P. (2004b). Mouse-ear of pecan: II. Influence of nutrient applications. *HortScience*, 39(1), 95-100. Retrieved from <http://hortsci.ashspublications.org/content/39/1/95.full.pdf+html>
- Wood, B. W., Reilly, C. C., & Nyczepir, A. P. (2004c). Mouse-ear of pecan: a nickel deficiency. *HortScience*, 39(6), 1238-1242. Retrieved from <http://hortsci.ashspublications.org/content/39/6/1238.full.pdf+html>
- Wood, B. W., Reilly, C. C., & Nyczepir, A. P. (2004d). Nickel deficiency is occurring in orchard trees. *HortScience*, 39(4), 858. Retrieved from <http://hortsci.ashspublications.org/content/39/4/858.2.full.pdf+html>
- Wood, B. W., Reilly, C. C., & Nyczepir, A. P. (2006). Field deficiency of nickel in trees: symptoms and causes. *Acta Horticulturae*, 721, 83-87. Retrieved from <http://naldc.nal.usda.gov/naldc/download.xhtml?id=23592&content=PDF>
- Zambelli, B., Berardi, A., Martin-Diaconescu, V., Mazzei, L., Musiani, F., Maroney, M. J., & Ciurli, S. (2014). Nickel binding properties of *Helicobacter pylori* UreF, an accessory protein in the nickel-based activation of urease. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 19(3), 319-334. doi: 10.1007/s00775-013-1068-3